مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۳۲، شماره ۱، سال ۱۳۹۵

شناسایی ژنوتیپ‌های مقاوم نخود به نژادهای ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی با استفاده از نشانگرهای مولکولی

Identification of Resistant Chickpea Genotypes to Races 1,2,3,4 and 5 of *Fusarium oxysporum* f.sp *ciceri*, the Cause of Fusarium Wilt Using Molecular Markers

سمیه فراهانی[۱]، بهار مرید[۲] و مژده ملکی[۳]

۱ و ۳- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین- پیشوا، دانشکده کشاورزی، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، ورامین
۲- استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تاکستان، دانشکده کشاورزی، گروه گیاهپزشکی، تاکستان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۲/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۷/۲۳

چکیده

فراهانی، س.، مرید، ب. و ملکی، م. ۱۳۹۵. شناسایی ژنوتیپ‌های مقاوم نخود به نژادهای ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی با استفاده از نشانگرهای مولکولی. **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۳۲:** ۴۲-۲۷.

پژمردگی فوزاریومی دومین بیماری مهم نخود محسوب می‌شود. کاهش سالیانه محصول در اثر این بیماری۱۰ تا ۹۰ درصد تخمین زده شده است. توانایی بقای بیمارگر در خاک برای چندین سال حتی در غیاب میزبان، کنترل این بیماری را بسیار مشکل کرده است. استفاده از ارقام مقاوم نخود نسبت به پژمردگی فوزاریومی، مؤثرترین و سازگارترین روش با محیط زیست است. در این مطالعه نشانگرهای مولکولی RAPD و SCAR برای شناسایی ژنوتیپ‌هایی از نخود که حامل ژن‌های مقاومت به نژادهای ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ قارچ عامل بیماری هستند مورد استفاده قرار گرفتند. از ۴۲ ژنوتیپ نخود، DNA به روش CTAB استخراج شد، سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از نشانگر مولکولی $CS\text{-}27_{700}$ وCS-27 انجام شد. تعدادی از ژنوتیپ‌ها انتخاب و در شرایط گلخانه مقاومت آن‌ها نسبت به چهار نژاد 0، ۱، ۲ و ۵ قارچ عامل بیماری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ۴۱ ژنوتیپ از ۴۲ ژنوتیپ مورد بررسی نسبت به هر پنج نژاد بیمارگر حساس و فاقد هر گونه ژن مقاومتی بودند و تنها لاین Flip 06-152c نسبت به پنج نژاد ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ مقاوم بود. نتایج ارزیابی فنوتیپی مقاومت ارقام و لاین‌ها در گلخانه، نتایج حاصل از بررسی مولکولی را تأیید کرد.

واژه‌های کلیدی: نخود، پژمردگی فوزاریومی، نژادها، ژن های مقاومت، نشانگر SCAR.

نویسنده مسئول: b.morid@tiau.ac.ir تلفن: ۰۲۸۳۵۲۷۰۱۵۸

مقدمه

بیماری پژمردگی فوزاریومی و یا بوته زردی نخود توسط قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* (*FOC*) ایجاد می‌شود (Jalali and Chand, 1992).

این بیماری اولین بار از هند گزارش شد (Jimenez- Diaz *et al*., 1992؛ Singh, 2003). بیماری پژمردگی فوزاریومی نخود از تمام مناطق نخودکاری جهان از جمله شبه قاره هند، ایران، پرو، سوریه، اتیوپی، مکزیک، اسپانیا، تونس، ترکیه، آمریکا و شوروی سابق گزارش شده است (Westerland *et al*., 1974؛ Trampero-Casas and Jemenez- Diaz, 1985). در ایران ابتدا قارچ *F. lateritium* f. sp. *ciceris* به عنوان عامل بیماری گزارش شده بود (Manoocheri and Mesri Alamdari, 1966). ولی بعداً در کرج عامل بیماری *F. oxysporum* شناسایی شد (Gerlach and Ershad, 1970).

بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که ۱۹ درصد نخود در شمال غرب کشور در سال ۱۳۷۸ به این بیماری آلوده بودند و شدت بیماری ۶۰- ۵ درصد بوده است (Akem, 1988). خسارت بیماری در جهان ۹۰-۱۰ درصد برآورد شده است (Jimenez- Diaz *et al*., 1989؛ Singh and Reddy, 1991). همه‌گیری بیماری گاهی سبب خسارت عمده به محصول می‌شود و در شرایط مساعد توسعه بیماری، میزان خسارت به ۱۰۰ درصد نیز می‌رسد (Halila and Strange, 1996؛ Landa *et al*., 2004). قارچ عامل بیماری خاکزی است و به صورت کلامیدوسپور در بذر و بقایای گیاهی مرده در خاک ادامه حیات می‌دهد و می‌تواند در خاک بیش از پنج سال بقای خود را حفظ کند (Singh, 2003). امروزه سعی بر این است که استفاده از سموم شیمیایی به دلیل آلودگی‌های زیست محیطی و خطرات جدی که برای مصرف کنندگان ایجاد می‌کنند محدود شوند، بنابراین مقاومت ژنتیکی و استفاده از ارقام مقاوم مناسب‌ترین روش کنترل این بیماری است. انتخاب فنوتیپی ارقام مقاوم کاری پیچیده و بسیار زمان‌بر است. استفاده از نشانگرهای مبتنی بر DNA در برنامه‌های اصلاح گیاهان تجاری، کمک بزرگی برای شناسایی ارقام مقاوم است (Tanksley *et al*., 1992).

روش RAPD یک ابزار تشخیصی قدرتمند برای شناسایی همه نژادهای اصلی *FOC* در نواحی مدیترانه گزارش شده است (Jimenez-Gasco *et al*., 2001).

تا به حال هشت نژاد (0، 1A، 1B/C، 2، 3، 4، 5 و 6) عامل بیماری با استفاده از آزمون‌های بیماری‌زایی روی ده رقم افتراقی نخود تعیین شده است (Haware *et al*., 1980؛ Jimenez- Diaz *et al*., 1992). نژادهای 1A، 2، 3، 4، 5 و 6 باعث ایجاد پژمردگی و نژادهای 0 و 1B/C باعث زردی می‌شوند

(Jimenez- Diaz *et al*., 1992). همچنین دو کلاستر مجزا برای ژن‌های مقاومت (R genes) به بیماری پژمردگی فوزاریومی شناسایی شده است: گروه لینکاژی [LG2کروموزوم F (یا G)] که یک کلاستر ژنی متشکل از پنج ژن *foc*-1، *foc*-2، *foc*-3، *foc*-4 و *foc*-5 است و در برگیرنده ژن‌های مؤثر علیه پاتوتیپ‌های پژمردگی است. گروه لینکاژی دیگر LG-[3کروموزوم (یا D)]که در برگیرنده ژن مقاومت به پاتوتیپ زردی (نژاد 0) است. ژن‌های مقاومت به نژادهای 6 و 1B/C هنوز مکان‌یابی نشده‌اند (Sharma and Muehlbauer, 2007).

در سال‌های ۱۹۹۶ و ۲۰۰۰ از نشانگر RAPD برای شناسایی ژن‌های مقاومت نسبت به بیماری های سفیدک پودری در کرچک (Singh *et al*., 2011)، پژمردگی فوزاریومی، آنتراکنوز و زنگ در لوبیا (Young and Kelly, 1996؛ Falerio *et al*., 2000a)، آلترناریا در هیبریدهای نارنگی (Dalkilic *et al*., 2005) و پژمردگی فوزاریومی در بادنجان (Mutlu, 2008) شناسایی ژن مقاومت نسبت به قارچ *Cladosporium flavum* در گوجه فرنگی (Wang *et al*., 2007) و شناسایی ارقام مقاوم برنج نسبت به بیماری بلاست (Araujo *et al*., 2010) استفاده شده است.

از نشانگرهای SCAR برای شناسایی ژن‌های مقاومت نسبت به بیماری‌های لکه برگی سرکوسپورایی سویا (Filho *et al*., 2000)، پوسیدگی قرمز ریشه توت فرنگی (Haymes *et al*., 2000)، پژمردگی ورتیسیلیومی و کلادوسپوریوم در گوجه‌فرنگی (Wang *et al*., 2007؛ Kawchuk *et al*., 1998)، بلایت باکتریایی، زنگ، کپک سفید، آنتراکنوز و پژمردگی فوزاریومی در لوبیا (Miklas *et al*., 2009؛ Park *et al*., 2008؛ Soule *et al*., 2011؛ Vallejo and Kelly, 2008؛ Brick *et al*., 2006) استفاده شده است.

هدف از انجام این پژوهش ردیابی ژن‌های مقاومت و حساسیت ۴۲ ژنوتیپ نخود در برابر *FOC* با استفاده از نشانگر RAPD و SCAR و تایید نتایج حاصل از ارزیابی فنوتیپی در گلخانه بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این تحقیق از ۴۲ رقم و لاین نخود استفاده شد. بذر این ژنوتیپ‌ها از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج و مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم مراغه دریافت شد (جدول ۱).

تهیه گیاهچه برای استخراج DNA: از هر ژنوتیپ پنج بذر در گلدان کاشته و گلدان‌ها در گلخانه در دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در مرحله ۴ تا ۵ برگی، برگ‌های گیاهچه‌ها برای تهیه عصاره مورد

جدول ۱- نام و مشخصات ارقام و لاین های آزمایشی نخود

Table 1. Name and specifications of experimental chickpea cultivars and lines

No./شماره	Line/Cultivar	لاین/رقم	Received Institute	موسسه محل دریافت	Origin	منشاء
1	Azad	آزاد	DARI	موسسه تحقیقات کشاورزی دیم	ICARDA	ایکاردا
2	Arman	آرمان	DARI	موسسه تحقیقات کشاورزی دیم	ICARDA	ایکاردا
3	Kc215474	-	SPII	موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر	Khorasan Razavi	خراسان رضوی
4	Hashem	هاشم	DARI	موسسه تحقیقات کشاورزی دیم	ICARDA	ایکاردا
5	Kc216193	-	SPII	موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر	Tehran	تهران
6	Kc215950	-	SPII	موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر	Khorasan Razavi	خراسان رضوی
7	Kc215920	-	SPII	موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر	Khorasan Razavi	خراسان رضوی
8	Kc215079	-	SPII	موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر	Mazandaran	مازندران
9	Kc215887	-	SPII	موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر	East Azarbaijan	آذربایجان شرقی
10	Bionej	بیونیژ	DARI	موسسه تحقیقات کشاورزی دیم	ICARDA	ایکاردا
11	Kc216084	-	SPII	موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر	East Azarbaijan	آذربایجان شرقی
12	Fillip 97-102c	-	DARI	موسسه تحقیقات کشاورزی دیم	ICARDA	ایکاردا
13	KC216313	-	SPII	موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر	East Azarbaijan	آذربایجان شرقی
14	ILC482	-	DARI	موسسه تحقیقات کشاورزی دیم	ICARDA	ایکاردا
15	KC215377	-	SPII	موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر	Khorasan Razavi	خراسان رضوی
16	Jam	جم	DARI	موسسه تحقیقات کشاورزی دیم	Isfahan	اصفهان
17	KC216194	-	SPII	موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر	Tehran	تهران
18	Kc215004	-	SPII	موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر	Markazi Provonce	استان مرکزی
19	Kc216223	-	SPII	موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر	Bakhtaran	باختران
20	Filip97-116c	-	DARI	موسسه تحقیقات کشاورزی دیم	ICARDA	ایکاردا
21	KC 215437	-	SPII	موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر	Khorasan Razavi	خراسان رضوی
22	KC215909	-	SPII	موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر	East Azarbaijan	آذربایجان شرقی
23	KC 215002	-	SPII	موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر	Markazi	مرکزی
24	KC 216364	-	SPII	موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر	East Azarbaijan	آذربایجان شرقی
25	KC 216195	-	SPII	موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر	Isfahan	اصفهان
26	Kc 216228	-	SPII	موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر	East Azarbaijan	آذربایجان شرقی
27	Khoram Abad	خرم آباد	DARI	موسسه تحقیقات کشاورزی دیم	Khoram Abad	خرم آباد
28	Kc 215543	-	SPII	موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر	Fars	فارس
29	Filip97-109c	-	DARI	موسسه تحقیقات کشاورزی دیم	ICARDA	ایکاردا
30	Kc 215858	-	SPII	موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر	Khorasan Razavi	خراسان رضوی
31	Filip08-90c	-	DARI	موسسه تحقیقات کشاورزی دیم	ICARDA	ایکاردا
32	Filip05-77c	-	DARI	موسسه تحقیقات کشاورزی دیم	ICARDA	ایکاردا
33	Filip07-177c	-	DARI	موسسه تحقیقات کشاورزی دیم	ICARDA	ایکاردا
34	Filip06-152c	-	DARI	موسسه تحقیقات کشاورزی دیم	ICARDA	ایکاردا
35	Filip08-93c	-	DARI	موسسه تحقیقات کشاورزی دیم	ICARDA	ایکاردا
36	Filip07-123c	-	DARI	موسسه تحقیقات کشاورزی دیم	ICARDA	ایکاردا
37	Filip07-216c	-	DARI	موسسه تحقیقات کشاورزی دیم	ICARDA	ایکاردا
38	Filip03-28c	-	DARI	موسسه تحقیقات کشاورزی دیم	ICARDA	ایکاردا
39	Filip07-197c	-	DARI	موسسه تحقیقات کشاورزی دیم	ICARDA	ایکاردا
40	Filip08-81c	-	DARI	موسسه تحقیقات کشاورزی دیم	ICARDA	ایکاردا
41	Filip02-04c	-	DARI	موسسه تحقیقات کشاورزی دیم	ICARDA	ایکاردا
42	Filip05-183c	-	DARI	موسسه تحقیقات کشاورزی دیم	ICARDA	ایکاردا

DARI: Dryland Agricultural Research Institute, Maragheh, Iran.
SPII: Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran.
ICARDA: International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, Aleppo, Syria.

استفاده قرار گرفت.

استخراج DNA از بافت گیاهی: برای استخراج DNA از روش CTAB با اندکی تغییرات استفاده شد (Ausubel *et al*., 1994)

و DNA از ۰/۰۵ میلی‌گرم بافت تازه برگ گیاهان نخود استخراج شد.

ارزیابی مولکولی

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تعیین ژن‌های مقاومت به نژادهای ۱، ۴ و ۵ با استفاده از نشانگر RAPD به نام CS-27700 انجام شد. اجزای واکنش در جدول ۲ آورده شده است.

برنامه حرارتی شامل واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد پنج دقیقه بود و به دنبال آن ۳۵ چرخه با واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰۵ ثانیه که با یک بسط انتهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه خاتمه یافت. قطعات تکثیر شده روی ژل آگاروز ۲٪ الکتروفورز شدند. ژل‌ها با رنگ ژل رد رنگ‌آمیزی شدند. سپس زیر نور UV مشاهده و از آن‌ها عکس تهیه شد.

جدول ۲- اجزای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای استفاده از نشانگر $CS\text{-}27_{700}$

Table 2. Components of polymerase chain reaction for using $CS\text{-}27_{700}$ marker

PCR buffer (10X)	2.5 µl
$MgCl_2$ (50 mm)	0.75 µl
dNTP (10 mm)	0.5 µl
Primer (10 pmolml^{-1})	1.0 µl
Taq DNA polymerase (5 unit ml^{-1})	0.25 µl
DNA	2.0 µl
ddH_2O	18.0 µl

تکه‌اوغلو و همکاران (Tekeoglu *et al.,* 2000) بعد از کلون کردن و تعیین توالی نشانگر CS-27، آن را به عنوان نشانگر اختصاصی آلل با نام $CS\text{-}27_{700}$ F/R طراحی کردند.

برای تعیین ژن‌های مقاومت به‌نژادهای ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ قارچ، از نشانگر SCAR با نام CS-27 استفاده شد. اجزای واکنش در جدول ۳ آورده شده است. در این آزمایش برنامه حرارتی شامل واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد پنج دقیقه و به دنبال آن ۳۵ چرخه با واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، اتصال در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه که با یک بسط انتهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت

جدول ۳- اجزای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای استفاده از نشانگر CS-27
Table 3. Components of polymerase chain reaction for using CS-27 marker

PCR buffer (10X)	2.5 µl
$MgCl_2$ (50 mm)	0.9 µl
dNTP (10 mm)	0.5 µl
Primer F (10 $pmolml^{-1}$)	1.0 µl
Primer R (10 $pmolml^{-1}$)	1.0 µl
Taq DNA polymerase (5 $unitml^{-1}$)	0.25 µl
DNA	2.0 µl
ddH_2O	16.85 µl

۸ دقیقه خاتمه یافت. قطعات تکثیر شده روی ژل آگاروز ۲٪ الکتروفورز، با رنگ ژل رد رنگ آمیزی و سپس زیر نور UV از آن ها عکس تهیه شد.

ارزیابی مقاومت ارقام و لاین‌های نخود در گلخانه (ارزیابی فنوتیپی)

در این بررسی از نمونه‌های قارچ عامل بیماری که از استان ایلام توسط بیگی (Beigi, 2013) جمع‌آوری شده و با استفاده از آغازگرهای مولکولی نژادهای آن‌ها شناسایی شده بود استفاده شد. مایه تلقیح از نژاد ۱،۲ و ۵ تهیه شد.

بر اساس تحقیقات بیگی و همکاران (۲۰۱۳) نژادهای ۳ و ۴ در استان ایلام یافت نشده است و بیشترین تنوع ژنتیکی مربوط به نژاد o، 1B/C، 5 و 6 بود. ژن های مقاومت به نژادهای 1B/C و 6 هنوز مکان یابی نشده‌اند و با استفاده از مارکرهای مولکولی CS-27 و $CS\text{-}27_{700}$، مقاومت به نژاد صفر قابل بررسی نیست زیرا ژن‌های مقاومت به پاتوتیپ زردی (نژاد صفر) روی کروموزوم C در منطقه ۳ تا ۶ قرار دارند (Sharma and Muehlbauer, 2007).

هر نژاد در یک ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت PDB کشت داده شد و در شیکر- انکوباتور با سرعت ۱۲۵ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت هفت روز زیر نور فلورسنت با ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شد.

کشت مایع از گاز استریل دو لایه عبور داده شد و تعداد اسپورها با لام هماسیتومتر شمارش و غلظت سوسپانسیون ۴×۱۰^{۶} cfu/g تنظیم شد. مخلوط شن و آرد ذرت (به نسبت وزنی ۹ به ۱) تهیه و دو بار هر بار به مدت یک ساعت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل شد. سوسپانسیون اسپور به این مخلوط اضافه و به مدت ۱۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و زیر نور فلورسنت نگهداری شد

(Trampero-Casas and Jimenez-Diaz, 1985؛ Haware, 1980).

به دلیل تعدد زیاد ژنوتیپ‌ها و این که هدف از انجام آزمایش‌های فنوتیپی تنها تائید نتایج مولکولی بود، تنها شانزده رقم و لاین نخود در آزمایش گلخانه‌ای مورد استفاده قرار گرفتند. بذرهای نخود به منظور جوانه‌زنی در سینی‌های حاوی شن که دو بار هر بار به مدت یک ساعت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل شده بودند قرار داده شدند.

مایه تلقیح با غلظت cfu/g $۴×۱۰^۶$ به خاک گلدان‌های پلاستیکی ۰/۵ لیتری حاوی خاک-شن- پیت که دو بار هر بار به مدت یک ساعت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل شده بود، اضافه و مخلوط شد (Kaiser *et al*., 1994).

از هر رقم ده عدد بذر روی محیط کشت PDA قرار داده شد تا از عدم آلودگی آن‌ها اطمینان حاصل شود. بذرهای سالم از پیش جوانه زده شده به گلدان‌ها منتقل شدند. در هر گلدان سه بذر قرار داده شد و برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. از هر ژنوتیپ سه گلدان به عنوان شاهد (خاک بدون مایه تلقیح) تهیه شد.

اولین آبیاری بعد از کاشت به میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر انجام شد و از روز دوم گلدان‌ها روزانه با ۵۰ میلی‌لیتر آب آبیاری شدند. گلدان‌ها در گلخانه با دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد و شرایط عادی نور نگهداری شدند.

پیشرفت بیماری از روز ۱۰ تا ۵۰ هر پنج روز یک بار بررسی شد. علایم و شدت بیماری با روش مشاهده عینی یادداشت‌برداری شدند و در آخر براساس بیشترین شدت بیماری، ژنوتیپ‌ها از نظر تیپ‌های آلودگی واکنش آن تعیین شد (جدول ۴).

در پایان آزمایش برای تأیید گونه قارچ عامل بیماری، گیاهان آلوده از گلدان‌ها خارج شده و نتایج با اصول کخ تأیید شدند. برای شناسایی از کلید شناسایی Nelson *et al.* (1983) استفاده شد.

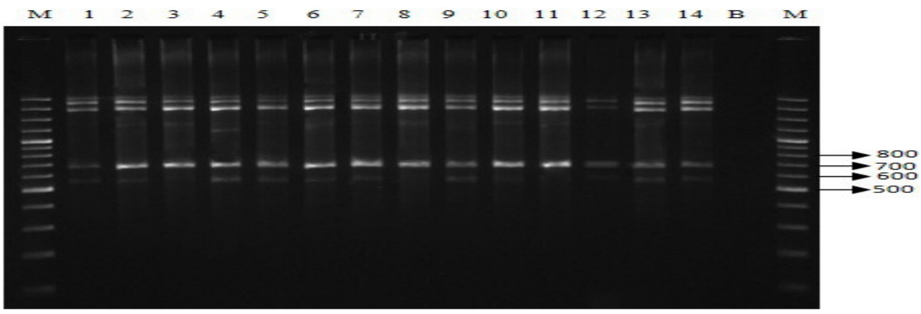
نتایج و بحث

نتایج الگوی نواری حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از نشانگر RAPD : نشانگر RAPD با نام $CS\text{-}27_{700}$ به گونه‌ای طراحی شده است که ژن‌های مقاومت به هر سه نژاد ۱، ۴ و ۵ را در قارچ *F. oxysporum* f. sp. *ciceri* مشخص می‌کند (Sharma and Muehlbauer, 2007). بر این اساس ژنوتیپ‌هایی که فاقد ژن مقاومت هستند با این نشانگر باندی به وزن ۷۰۰ جفت باز تولید می‌کنند. نتایج نشان داد که تمامی ژنوتیپ‌ها به جزء لاین Flip06-152c (شکل شماره ۳، ردیف ۳۴) دارای باند ۷۰۰ جفت بازی بودند، (شکل‌های ۱، ۲ و ۳) بنابراین فقط لاین Flip06-152c دارای ژن مقاومت بود و سایر ژنوتیپ‌های مورد بررسی فاقد ژن مقاومت به سه نژاد ۱، ۴ و ۵ بودند.

جدول ۴- نحوه یادداشت برداری از تیپ آلودگی و تعیین واکنش ژنوتیپ های نخود نسبت به قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*

Table 4. Assessment of infection type and response of chickpea genotypes to *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*

Response	واکنش	تیپ آلودگی Infection type	Visual Symptoms	علائم ظاهری
Resistant (R)	مقاوم	0	No symptom	بدون علائم
Moderately Resistant (MR)	نیمه مقاوم	1	Slight chlorosis	کلروز ملایم
Moderately Susceptible (MS)	نیمه حساس	2	Medium chlorosis	کلروز متوسط
Susceptible (S)	حساس	3	Severe chlorosis + wilting	کلروز یا پژمردگی شدید
Very Susceptible (VS)	بسیار حساس	4	Dead of plant	مرگ گیاه

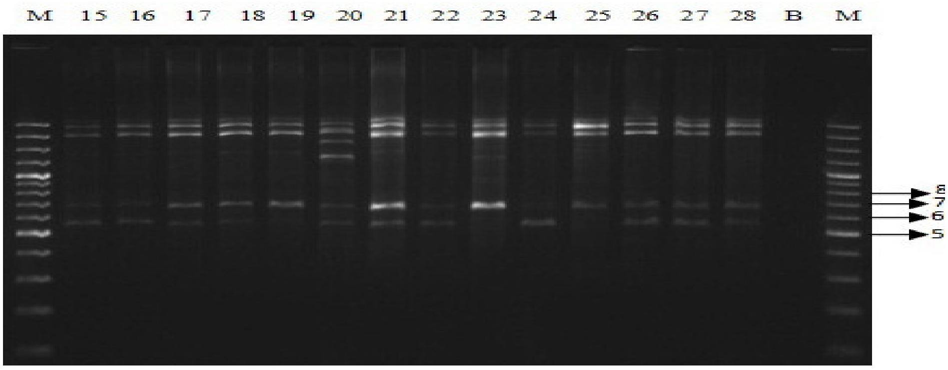


شکل ۱- محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از نشانگر $CS\text{-}27_{700}$ ، ۱۴-۱: شماره ژنوتیپ‌ها مطابق جدول ۱ است.

M: مارکر 100bp (شرکت Metabion، آلمان)، B: بلانک

Fig. 1. Polymerase chain reaction products using $CS\text{-}27_{700}$ marker, 1-14 genotypes numbers are according to the Table 1.

M: marker 100bp (by Metabion, Germany), B: Blank

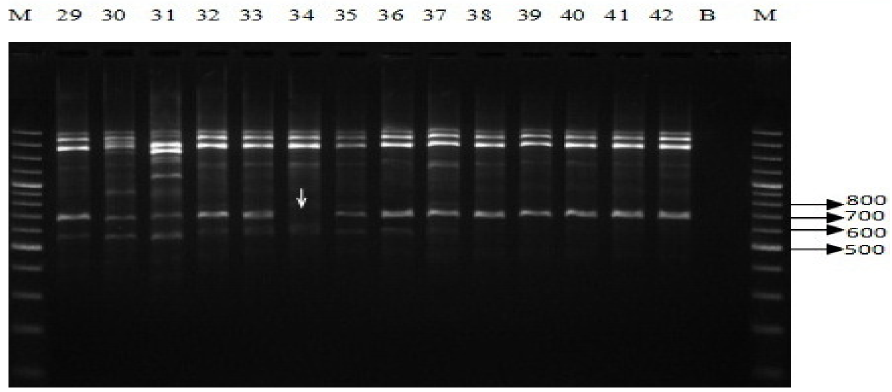


شکل ۲- محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از نشانگر $CS\text{-}27_{700}$ ، ۲۸-۱۵: شماره ژنوتیپ‌ها مطابق جدول ۱ است.

M: مارکر 100bp (شرکت Metabion، آلمان) B: بلانک

Fig. 2. Polymerase chain reaction products using $CS\text{-}27_{700}$ marker, 15-28 genotypes numbers are according to the Table 1.

M: marker 100bp (by Metabion, Germany), B: Blank



شکل ۳- محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از نشانگر $CS\text{-}27_{700}$ ، ۴۲-۲۹: شماره ژنوتیپ‌ها مطابق جدول ۱ است.

M: مارکر 100bp (شرکت Metabion، آلمان) B: بلانک

Fig. 3. Polymerase chain reaction products using $CS\text{-}27_{700}$ marker, 29-42 genotypes numbers are according to the Table 1.

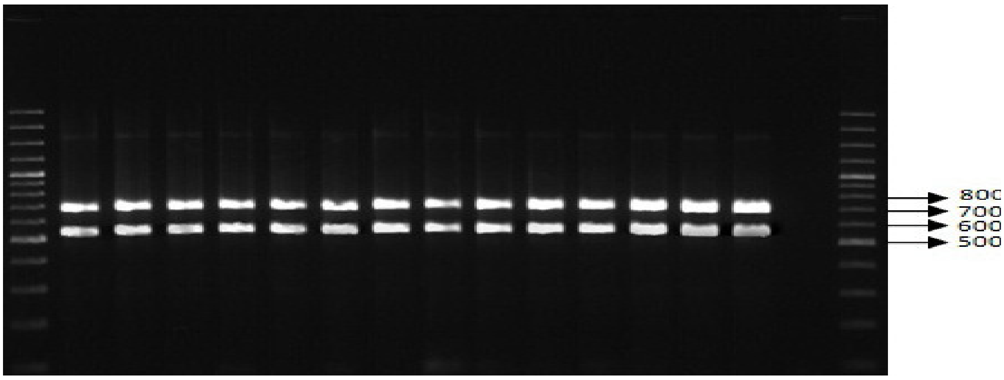
M: marker 100bp (by Metabion, Germany), B: Blank

نتایج الگوی نواری حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از نشانگر SCAR

نشانگر SCAR با نام CS-27 در ژنوتیپ‌های فاقد ژن مقاومت به نژادهای ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ تولید باندی به وزن ۷۰۰ جفت باز می‌کند. این نشانگر در ژنوتیپ‌های فاقد ژن مقاومت به نژاد ۳ علاوه بر این باند تولید باندی شاخص به وزن تقریبی ۵۶۵ جفت باز می‌کند (Sharma and Muehlbauer, 2007). نتایج نشان داد ۴۱ ژنوتیپ از ۴۲ ژنوتیپ مورد بررسی دارای باند ۷۰۰ جفت بازی بودند که نشان دهنده عدم وجود ژن‌های مقاومت به نژادهای ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ در آن‌ها بود. علاوه بر این، ژنوتیپ‌های حساس با این نشانگر تولید باندی به وزن تقریبی ۵۶۵ جفت کردند، که تأکیدی بر حساسیت این ۴۱ ژنوتیپ به نژاد ۳ بود. (شکل‌های ۴، ۵ و ۶).

نتایج ارزیابی فنوتیپی ارقام ولاین‌های نخود نسبت به نژادهای 1A، 2 و 5 عامل بیماری: تیپ آلودگی و واکنش شانزده ژنوتیپ مورد نخود نسبت به بیماری پژمردگی فوزاریومی در جدول ۵ آمده است.

تهیه ارقام مقاوم نخود مهم‌ترین و اقتصادی‌ترین روش کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی است. استفاده از ارقام مقاوم مزایای زیادی نسبت به به کارگیری ترکیبات شیمیایی و سایر روش‌های مبارزه دارد، زیرا هزینه سموم، نیروی کار و زمان کاهش پیدا می‌کند. مقاومت ژنتیکی ناشی ازحضور ژن‌های مقاومت علیه بیماری‌ها در ژنوم گیاه است. شناسایی ژن‌های مقاومت در ارقام نخود مهم‌ترین گام به منظور دستیابی به ارقام تجاری مقاوم به این بیماری است. تاکنون روش‌های مختلفی به‌منظور بررسی ژن‌های مقاومت به پژمردگی فوزاریومی نخود و

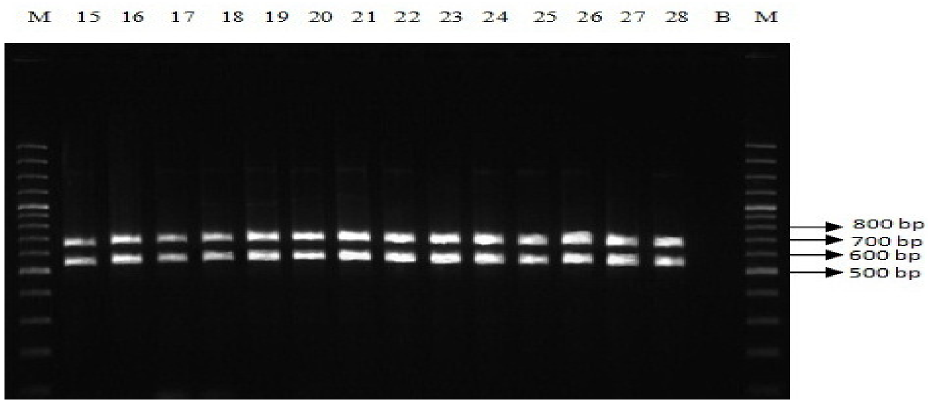


شکل ۴- محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از نشانگر CS-27 ، ۱۴-۱: شماره ژنوتیپ‌ها مطابق جدول ۱ است.

M: مارکر 100bp (شرکت Metabion، آلمان) B: بلانک

Fig. 4. Polymerase chain reaction products using CS-27 marker, 1-14 genotypes numbers are according to the Table 1.

M: marker 100bp (by Metabion, Germany), B: Blank

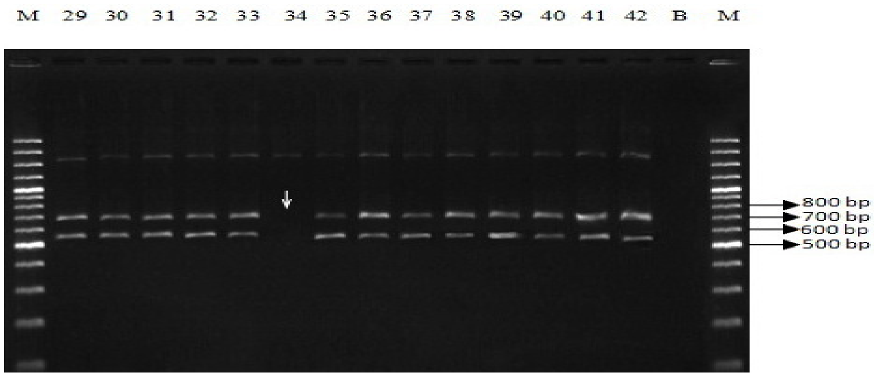


شکل ۵- محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از نشانگر CS-27، ۲۸-۱۵: شماره ژنوتیپ‌ها مطابق جدول ۱ است.

M: مارکر 100bp (شرکت Metabion، آلمان) B: بلانک

Fig. 5. Polymerase chain reaction products using CS-27 marker, 15-28 genotypes numbers are according to the Table 1.

M: marker 100 bp (by Metabion, Germany), B: Blank



شکل ۶- محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از نشانگر CS-27 ، ۴۲-۲۹: شماره ژنوتیپ‌ها مطابق جدول ۱ است.

M: مارکر 100bp (شرکت Metabion، آلمان) B: بلانک

Fig. 6. Polymerase chain reaction products using CS-27 marker, 29-42 genotypes numbers are according to the Table 1.

M: marker 100 bp (by Metabion, Germany), B: Blank

جدول ۵- تیپ آلودگی و واکنش ارقام و لاین‌های نخود نسبت به نژادهای *F. oxysporum* f.sp *ciceri* در گلخانه

Table 5. Infection type and response of chickpea cultivars and lines to races of *F. oxysporum* f.sp *ciceri* in greenhouse

Genotype name	نام ژنوتیپ	Race 1A تیپ آلودگی Infection type	نژاد 1A واکنش Response	Race 2 تیپ آلودگی Infection type	نژاد ۲ واکنش Response	Race 5 تیپ آلودگی Infection type	نژاد ۵ واکنش Response
Azad	آزاد	4	HS	4	HS	4	HS
Arman	آرمان	4	HS	4	HS	3	S
Hashem	هاشم	4	HS	4	HS	3	S
KC215079	-	3	S	3	S	4	HS
KC215887	-	3	S	3	S	3	S
Bionej	بیونیژ	4	HS	3	S	3	S
KC216084	-	3	S	3	S	1	MR
Jam	جم	3	S	3	S	3	S
KC216194	–	2	MS	2	MS	2	MS
KC216223	–	2	MS	2	MS	2	MS
KC215002	–	4	HS	4	HS	1	MR
KC216195	–	4	HS	2	MS	1	MR
KC216228	–	2	MS	4	HS	1	MR
Khoramabad	خرم آباد	1	MR	1	MR	3	S
KC215858	–	4	HS	2	MS	4	HS
Flip06-152c	–	0	R	0	R	0	R

R: Resistant مقاوم MS: Moderately Susceptible نیمه حساس HS: Highly Susceptible خیلی حساس
MR: Moderately Resistant نیمه مقاوم S: Susceptible حساس

تعیین ژنوتیپ مقاوم معرفی شده است. روش‌های کلاسیک نیازمند ارزیابی تعداد زیادی ژنوتیپ است، این نوع ارزیابی‌های فنوتیپی برای مقاومت به بیمارگر مشکل، پر هزینه و تحت تأثیر عوامل محیطی است (Gumber *et al.*, 1995؛ Huttle *et al.*, 2002؛ Landa *et al.*, 2004).

استفاده از نشانگرهای RAPD به دلیل شناسایی ساده و سریع و نیز عدم نیاز به آگاهی از توالی ژنومی نسبت به سایر روش‌ها بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. علاوه بر این در روش مذکور DNA به آسانی تکثیر شده و نیازی به استفاده از ایزوتایپ‌ها ندارد (Zhang *et al.*, 2005). از این روش به طور موفقیت‌آمیزی برای ایجاد نشانگرها در موجودات مختلف و همچنین ساخت نقشه‌های ژنتیکی استفاده شده است. نشانگر RAPD تعداد زیادی از نشانگرهای چند جایگاهی را فراهم می‌کند که می‌توانند نمونه‌ها را با وضوح بالا از متمایز کنند (Singh, *et al.*, 2011). نشانگرهای RAPD زمانی برای انتخاب بر مبنای نشانگر مفید هستند که با درجه اطمینان بالا به ژنی مقاوم نسبت به یک بیماری یا صفات دیگر مرتبط بوده و از یک لاین منفرد غالب به تعداد زیادی جمعیت‌های مختلف منتقل شوند (Brown and Myers, 2001).

در ایـــران مطالعاتـــی بـــا اســـتفاده از نشـــانگر مولکـــولی SCAR روی شناســـایی ارقـام مقـاوم لوبیـا بـه بیمـاری کپـک سفـید (Bakhshi *et al.*, 2013) و بـا اسـتفاده از نشـانگر RAPD در رابطـه بـا ردیـابی ژن هـای مقاومـت بــه پوسـیدگی فوزاریــومی طوقــه گوجــه فرنگـــی انجـــام شـــده اســـت (Morid and Hajmansoor, 2011).

از بین ۴۲ ژنوتیپ نخود مـورد بررسـی فقـط لاین Flip 06-152c نسبت به پنج نـژاد ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ مقـاوم بـود. نتـایج آزمـون بیمـاری‌زایـی (بررسی فنوتیپی) تأییـدی بـر نتـایج نشـانگرهای مولکولی (بررسی ژنوتیپی) بودند، بنابراین لایـن مقاوم شناسایی شده بـرای مطالعـات تکمیلـی در مزرعـه و در منـاطقی کـه بیمـارگر وجـود دارد توصیه می‌شود. یافته‌های این تحقیق بـا نتـایج بـه دست آمده از بررسی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی که توسـط حـاجی اللهوردی پـور و همکـاران (Hajiallahverdipour *et al.*, 2011) گـزارش شده همخوانی دارد.

References

Akem, C. 1998. Survey on chickpea diseases in Iran. ICARDA, Aleppo, Syria.

Araujo, L. G., Prabhu, A. S., Pereira, P. A., and Silva, G. B. 2010. Marker-assisted selection for the rice blast resistance gene *Pi-ar* in a back crosses population. Crop Breeding and Applied Biotechnology 10: 23-31.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. 1994. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons Inc., New York, USA.

Bakhshi, S., Morid, B., and Zamanizadeh, H. R. 2013. Identification of the resistance cultivar of *Phaseolus vulgaris* to *Scelerotinia sclerotorum* using SCAR marker. The Second Congress on Organic and Conventional Agriculture, Tehran, Iran (in Persian).

Beigi, A. 2013. Detection of genetic variation and identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in pea in Ilam region. MSc. Thesis, Islamic Azad University, Tehran Science and Research Branch, Tehran, Iran (in Persian).

Brick, M. A., Byrne, P. F., Schwartz, H. F., Ogg, J. B., Otto, K., and Fall, A. L. 2006. Reaction to three races of fusarium wilt in the *Phaseolus vulgaris* core collection. Crop Science 46: 1245-1252.

Brown, R. N., and Myers, J. R. 2001. RAPD Markers linked to morphological and disease resistance traits in squash, cucurbit. Genetics and Crop Reports 24: 91-93.

Dalkilic, Z., Timmer, L. W., and Gmitter, F. G. 2005. Linkage of an alternaria disease resistance gene in mandarin hybrids with RAPD fragments. Journal of American Society for Horticultural Science 130: 66-71.

Faleiro, F. G., Vinhadelli, W. S., Ragagnin, V. A., Correa, R. X., Moreira, M. A., and Barros, E. G. 2000. RAPD markers linked to a block of genes conferring rust resistance to the common bean. Genetics and Molecular Biology 23: 399-402.

Filho, S. M., Sediyama, C. S., Moreira, M. A., and de Barros, E. G. 2002. RAPD and SCAR markers linked to resistance to frog eye leaf spot in soybean. Genetics and Molecular Biology 25(3): 317-321.

Gerlach, W., and Ershad, J. 1970. Beitry zur kenntis der Fusarium und Cylindrocarpon. Nova Hedvingia 20: 725-784.

Gumber, R. K., Kumar, J., and Haware, M. P. 1995. Inheritance of resistance to fusarium wilts in chickpea. Plant Breeding 114: 277-279.

Hajiallahverdipour, K., Bahramnejad, B., and Amini, J. 2011. Selection of molecular markers associated with resistance to fusarium wilt disease in chickpea using multivariate statistical techniques. Australian Journal of Crop Science 5 (13): 1801-1809.

Halila, M. H., and Strange, R. N. 1996. Identification of the causal agent of wilt of chickpea in Tunisia as *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* race 0. Phytopathology 86: 67-74.

Haware, M. P., Kumar, J., and Reddy, M. V. 1980. Disease resistance in Kabuli-desi chickpea introgression. pp: 67-69. In: Haware, M. P., Kumar, J., and Reddy, M.V. (eds.) Proceedings of the International Workshop on Chickpea Improvement, ICRISAT, Hyderabad, India.

Haymes, K. M., van de Weg, W. E., and Arens, P. 2000. Development of SCAR markers linked to a *Phytophthora fragariae* resistance gene and their assessment in European and North American strawberry genotypes. Journal of American Society for Horticultural Science 125(3): 330-339.

Huttle, B., Santra, D., Muehlbauer, F. J., and Kahle, G. 2002. Resistance gene analogs of chickpea: isolation, genetic mapping and association with fusarium resistance gene cluster. Theoretical and Applied Genetics 105: 479-490.

Jalali, M., and Chand, L. 1992. Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Plant

Disease 66: 809-810.

Jimenez-Diaz, R. M., Basallote-Ureba, M. J., and Rappoport, H. 1989. Colonization and pathogenesis in chickpea infected by races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*. pp.113-121. In: Tjamos, E.C., and Beckmann, C. (eds.) Wascular Wilt Diseases of Palses. Springer Verlag, Berlin, Germany.

Jimenez-Diaz, R. M., Trapero-Casas, A. T., and Cubero, J. I. 1992. Importance of chickpea soil-borne diseases in the Mediterranean Basin. pp. 155-169 In: Singh, K. B., and Saxena, M. C. (eds.) Disease Resistance Breeding in Chickpea. ICARDA, Aleppo, Syria.

Jimenez-Gasco, M. M., Perez-Artes, E., and Jimenez-Diaz, R. M. 2001. Identification of pathogenic races 0, 1B/C, 5 and 6 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* with random amplified polymorphic DNA. European Journal of Plant Pathology 107: 237-248.

Kaiser,W. J., Alcala-Jimenez, A. R., Herves-Vargas, A., Trapero-Casas, J. L., and Jimenez-Diaz, R. M. 1994. Screening of wild Cicer species for resistance to races 0 and 5 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Plant Disease 78: 962-967.

Kawchuk, L. M., Hachey, J., and Lynch, D. R. 1998. Development of sequence characterized DNA markers linked to a dominant verticillium wilt resistance gene in tomato. Genome 41: 91-95.

Landa, B., Navas-Cortes, J. A., and Jimenez-Diaz, R. M. 2004. Integrated management of fusarium wilt of chickpea with sowing date, host resistance and biological control. Phytopathology 94: 946-960.

Manouchehri, A., and Mesri Alamdari, Y. 1966. Iranian chickpea fusarium wilt disease. Iranian Journal of Plant Pathology 3: 1-11 (in Persian).

Miklas, P. N., Fourie, D., Wagner, J., Larsen, R. C., and Mienie, C. 2009. Tagging and mapping *Pse*-1 gene for resistance to halo blight in common bean host differential cultivar UI-3. Crop Science 49: 41-48.

Morid, B., and Hajmansoor, S. 2011. Screening of resistance genes to fusarium crown rot disease in tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivars using RAPD markers. Journal of Microbial World 3(4): 251-259.

Mutlu, N., Boyac, F. H., Gocmen, M., and Abak, K. 2008. Development of SRAP, SRAP-RGA, RAPD, and SCAR markers linked with a fusarium wilt resistance gene

in eggplant. Theoretical and Applied Genetics 117: 1303-1312.

Nelson, P. E., Toussoun, T. A. and Marasas, W. F. O. 1983. Fusarium Species. An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, USA. 193 pp.

Park, S. O., Steadman, J. R., Coyne, D. P., and Crosby, K. M. 2008. Devlopment of a coupling pahse SCAR marker linked to the *Ur*-7 rust resistance gene and its occurrence in diverse common bean lines. Crop Science 48: 357-363.

Sharma, K. D., and Muehlbauer, F. J. 2007. Fusarium wilt of chickpea: physiological specialization, genetics of resistance and resistance gene tagging. Euphytica 157: 1-14.

Singh, K. B., and Reddy, M. V. 1991. Advances in disease-resistance breeding in chickpea. Advances in Agronomy 49: 191-222.

Singh, M., Chaudhuri, I., Mandal, S. K., and Chaudhuri, R. K. 2011. Development of RAPD markers linked to fusarium wilt resistance gene in castor bean (*Ricinus communis* L.). Genetics and Engineering Biotechnology Journal 28: 1-9.

Singh, S. D. 2003. Soil Borne Diseases of Chickpea. ICRICAT, Patancheru Pradesh, India.

Soule, M., Porter, L., Medina, J., Santana, G. P., Blair, M. W., and Miklas, P. N. 2011. Comparative QTL map for white mold resistance in common bean and characterization of partial resistance in dry bean lines VA19 and I9365-31. Crop Science 51: 123-139.

Tanksley, S. D., Ganal, M. W., Prince, J. P., de Vicente, M. C., Bonierbale, M. W., Broun, P., Fulton, T. M., Giovannoni, J. J., Martin, S., Messeguer, G. B., Miller, R. J. C., Paterson, A. H., Pineda, O., Ro, M. S., Wing, R. A., Wu, W., and Young, N. D. 1992. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. Genetics 132: 1141-1160.

Tekeoglu M., Santra, D. K., Kaiser, W. J., and Muehlbauer, F. J. 2000. Ascachyta blight resistance inheritance in three chickpea recombinant inbred line populations. Crop Science 40: 1251-1259.

Trampero-Casas, A. T., and Jimenez-Diaz, R. M. 1985. Fungal wilt and root rot of chickpea in southern Spain. Phytopathology 75: 1146-1151.

Vallejo, V. A., and Kelly, J. D. 2008. Molecular tagging and genetic characterization

of alleles at the *Co*-1 anthracnose resistance locus in common bean. Journal of Genetics and Evolution 1: 7-20.

Wang, A., Meng, F., Xu, X., Wang, Y., and Li, J. 2007. Development of molecular markers linked to *Cladosporium fulvum* resistance gene *Cf*-6 in tomato by RAPD and SSR methods. HortScience 42: 11-15.

Westerland, F. V., Campbell, R. N., and Kimble, K. A. 1974. Fungal root rot and wilt of chickpea in California. Phytopathology 64: 632-635.

Young, R. A., and Kelly, J. D. 1996. RAPD markers flanking the Are gene for anthracnose resistance in common bean. Journal of American Society for Horticultural Science 121: 37-41.

Zhang, H. Y., Liu, X., and He, Z. 2005. Random amplified DNA polymorphism of *Nicotianata tabacum* L. cultivars. Biologia Plantarum 49: 605-607.